

計畫編號：DOH95-DC-2028

行政院衛生署疾病管制局九十五年度科技研究計畫

病毒性腹瀉症候群分子檢測監測系統之發展及流行病學研究-III

研 究 報 告

執行機構：行政院衛生署疾病管制局 研究檢驗中心

計畫主持人：吳芳姿

研究人員：梁淑媛、莫之欣

執行期間：95年1月1日至95年12月31日

目 錄

封 面	頁 碼
摘要	3
壹、前言	5
貳、材料與方法	7
參、結果	11
肆、討論	14
伍、結論與建議	18
陸、參考文獻	19
柒、圖、表	21

計畫摘要：請摘述本計畫之目的與實施方法及關鍵詞

關鍵詞：腹瀉症候群、病毒性腸胃炎、輪狀病毒、星狀病毒、腺病毒、杯狀病毒

(請以 12 級標楷體繕打、段落設定為 1.5 行距)

引起腸胃炎症狀的原因很多，致病感染原包含細菌、寄生蟲及病毒等，在工業化國家，病毒是主要的感染原，如歐洲及美國每年病毒性引起之腸胃炎約佔 60 % 及 80 % (1,2) 能引起腸胃炎的病毒主要為輪狀病毒(*Rotavirus A*)，星狀病毒(*Astrovirus*)，腺病毒(*adenovirus*) 第 40、41 型，杯狀病毒之 *Sapovirus* (即原先之 Sapo-like virus) 及 *Norovirus* (即原先之 Norwalk-like virus)，其他如冠狀病毒(*Coronavirus*) A 型肝炎病毒(*Hepatitis A virus*) E 型肝炎病毒 *Hepatitis E virus* 及 *Aichivirus* 等也會有相似的症狀。主要的臨床症狀為水瀉及嘔吐，感染發病之病患多數都能自癒，但對於嬰幼兒及無法自我照護者，會因脫水而病情加重；傳染途徑多經由水或食物傳染。

病毒檢查鑑定方式不外乎：以電子顯微鏡(EM)方式直接觀察檢體中之病毒顆粒；以 ELISA 或 Latex 方式檢測病毒性蛋白；以 Probe 或 PCR 方式檢測病毒性基因；或以特定細胞培養病毒。觀察是否為病毒性腸胃炎需檢驗病患糞便檢體，無法以血清學方式檢測。因此，傳統方式藉由電子顯微鏡下觀察糞便懸浮液中是否存在病毒來鑑定，但受限於病毒的濃度需達 $10^{5-6}/g$ 糞便檢體 以上才能驗出，靈敏度不高且耗費人力(3)，而病毒檢驗之 gold standard 細胞培養方式，因食因性腸胃炎病毒不容易在細胞中生長，而無法以此方式鑑定。目前對於 rotavirus、astrovirus、adenovirus 第 40、41 型及 Norovirus 已可用 ELISA 方式檢測，此外，rotavirus、astrovirus、Sapovirus 亦可以 RT-PCR 方式檢測病毒之核酸，靈敏度可達 $10^{1-3}/g$ 糞便檢體；惟 Norovirus 病毒之基因變異性較高，要建立單一種核酸檢測方式較為困難。

在台灣，對於引起腸胃炎之病毒，目前並未有完整的研究報告。本局自 91 年起開始接受急性腹瀉性症候群通報，檢驗項目包括病毒性感染源 Rotavirus、Norovirus、Adenovirus 第 40 及 41 型 Astrovirus，細菌性之 *Campylobacter jejuni* *Clostridium diffici*

Salmonella、Shigella、Cholera 及 *E. coli* O157 等，檢出陽性率約佔 23 %；由於此類腹瀉病毒感染病毒量低，經由水或食物傳染，很容易在人口密集之托嬰中心、看護中心等公共場所造成群聚性感染，因此，需要建立靈敏度高及快速簡便之的檢測方式，可以容易早期發現陽性病患，防堵疫情再度擴散。因此本研究計劃一部份之研究重點，將發展以靈敏度高且快速之 Real time RT-PCR 建立病毒性腹瀉症候群檢測方法。另一方面，廣泛收集台灣地區歷年及各地之腹瀉症狀檢體，用已建立之 Real time RT-PCR 方法，分析本土地區腹瀉症候群中各類病毒之陽性率，並進一步建立基因分型分析方法。因為腹瀉性腸胃炎雖然疾病嚴重度不如呼吸道性疾病，致死率也低於呼吸道病毒，但在美國每年所造成的醫療成本是上億元，感染人數多達 44000 萬人次，因此疫苗開發在全球已是重要衛生政策。本研究對於台灣本地腹瀉病毒流行情形了解，及型別鑑定之資料可作為未來疫苗施打之參考資料。同時收集個案之基本資料，如年齡、季節分布及流行趨勢等，可建立台灣地區腹瀉疾病流行監測。同時有助於未來輪狀病毒孩童疫苗施打政策，及降低國家整體醫療成本。

本研究顯示，目前台灣地區病毒性急性腸胃炎，孩童主要感染原為輪狀病毒，其次為諾羅病毒。輪狀病毒感染多發生於較冷的月份，感染高峰出現在 3 月份，並且以 2 歲以下嬰幼童為主，臨床表現水瀉、嘔吐及脫水症狀相當明顯，有九成以上必須住院觀察與治療，流行基因型別以 G1、G2、G3、G9 為主，但也發現罕見之 G12 型感染。諾羅病毒感染在台灣地區主要以群聚型出現，經由腹瀉群聚通報感染諾羅病毒陽性率達 46.19 %，感染年齡層以成人為主，並多發生於人口密機構（如安養中心、養護所）或醫院之精神病房；主要流行基因型別約九成為 GII 型，包括 GII.2、GII.3、GII.4 GII.6，又以 GII.4 為主。

壹、前言

急性腸胃炎為全球性重要的健康衛生問題，引起腸胃炎的病毒主要為輪狀病毒 (Rotavirus A)，星狀病毒 (Astrovirus)，腺病毒 (adenovirus) 第 40、41 型，杯狀病毒之 Sapovirus (即原先之 Sapo-like virus) 及 Norovirus (即原先之 Norwalk-like virus)。在美國流行病學調查中，輪狀病毒及星狀病毒多發生於較冷的月份約 10 月至隔年 4 月，腺病毒全年發生率無多大差異。年齡分布：輪狀病毒易感染嬰兒及小於 5 歲之幼兒；星狀病毒及腺病毒主要感染幼童，但成人及較大之孩童也可能感染；Norovirus 對成人及較大之孩童感染率較高。本局曾對 2001 年 4 月至 2002 年 10 月間，至醫院就診之腹瀉孩童，作輪狀病毒之流行病學調查，結果顯示，於 10 歲以下之孩童感染率較高，並且在 1-2 月間為一高峰期。臺大醫院李君男教授對於急性腸胃炎中輪狀病毒研究分析結果，在 2002 年以前 G9 型輪狀病毒約佔 6 成，2003 年起病毒流行型別有轉變跡象，G9 型輪狀病毒僅佔 2 成，G1、2 型輪狀病毒約各佔 2 成，G3 型輪狀病毒約佔 4 成。

輪狀病毒為雙股 RNA 病毒，具有 11 個基因片段，不具外蛋白套膜，約有 6 種以上血清型，感染人類主要為 A 血清型。輪狀病毒不容易以細胞培養病毒，因此不易分離 (11)。檢測方式包括：糞便檢體之電子顯微鏡檢驗 (EM)、酶連免疫反應 (ELISA) 及乳膠凝集法 (Latex agglutination) (10)，或以分子生物學方式如 RT-PCR、核酸雜交法 (Probe hybridization) 檢測病毒核酸基因 (5)，以 RNA-PAGE 方式可以應用於流行病學分析 (6)。

星狀病毒屬於 Astroviridae，小 (28nm)、圓型、單股 + RNA 病毒，以其電顯觀察下星狀外型命名 (4, 12)。病毒引起的腸胃炎潛伏期約 3~4 天，症狀持續約 2~3 天，在免疫力差或免疫不全之病患症狀可持續至 12 天左右。其感染多發生於醫院、社區、家庭中或成人活動密集場所，在日本就曾發生大型的群聚性感染 (14, 15)。傳統以電子顯微鏡檢驗，但約只有 10% 會表現典型星狀外觀，並且病毒顆粒極小，因此容易產生偽陰性結果 (17) 而低估感染情形；目前檢測方法有 dot blot hybridization、PCR、EIA (7, 9, 17)。

Norovirus，屬於 Caliciviridae 單股 RNA 病毒（8）。具有三種基因型，其中第一、二型會感染人（3）。大型群聚性感染通常發生於醫院、學校及居家附近，目前多數感染源多為飲水或食物受污染，特別是貝殼類食物，並且多在冬天季節發病。傳統以電子顯微鏡檢驗，目前也有發展 EIA，但由於病毒基因及抗原變化性大（13），因此試劑的專一性效果並不好，至於流行病學調查，多使用 RT-PCR 方式（18）。

在台灣，對於引起腸胃炎之病毒，除輪狀病毒有較詳細研究外，目前並未有完整的研究。在本局急性腹瀉症候群通報中檢出病源體機率亦相當低，因此，為了解完整的腹瀉病因及台灣地區之流行情形，需將有關之致病原研究分析，並發展有效的檢測方法。

貳、材料與方法

第三年(95年度)研究計劃的研究重點分為三部份,第一,增加因急性腸胃炎(腹痛或腹瀉)而至醫院掛急診的病患之糞便檢體;第二,建立腹瀉病毒—腺病毒(Adenovirus)及 Sapovirus 的檢驗方式,第三、並將檢測到的腹瀉病毒序列與過往病毒序列做演化分析。

● 檢體收集及資料建立：

檢體來源--

1. 合作醫院：於北、中、南分別各找一家合作醫院，林口長庚醫院、彰化基督教醫院、高雄長庚醫院，收集 10 歲以下腹瀉孩童糞便檢體。
2. 腹瀉群聚事件檢體：收集托嬰中心、看護中心、學校等公共場所或醫療單位腹瀉病患本年腹瀉症候群通報群聚腹瀉之糞便檢體。
3. 急診病患：收集因急性腸胃炎（腹痛或腹瀉）急診就醫的病患之糞便檢體。

資料建立--個案檢體建檔--包括患者姓名、性別、年齡、發病日、現居住地區、通報醫院、臨床症狀、檢驗結果等。

● Real-time PCR 分析：

(一)諾羅病毒分析:依 Similarity Plot 分析(13)諾羅病毒基因於 RNA dependent RNA polymerase 區域至核蛋白 N 端區間具極高穩定性,GI 型於病毒核酸序列 4856 至 4773 間之 123 bp, GII 型於病毒核酸序列 4988 至 5108 間之 120 bp,序列如表一。

Real-time RT-PCR 為單步驟反應,分成兩管作 GI 或 GII 反應,反應總體積 25 μ L,各加入 5 μ L 病毒 RNA 抽取液,及混合液內含 5 μ L 5 \times TaqMan EZ 緩衝液 (Applied Biosystems), 3mM Mn(Oca)₂, dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300 μ M, 2.5U rTth DNA Polymerase, 0.25U AmpErase UNG,分別加入 GI 引子 300 nM SR33、SR48、SR50、SR52 及 200nM NoroG1D7Probe 探針,或 GII 引子 400 nM COG2F、

COG2R 及 TaqMan 探針 200 nM RING2 進行 Real Time RT-PCR。反應程序為：60 30min, 95 5min, 之後進入 45 個循環：94 20sec, 60 1min。結果由 ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems)偵測分析。

(二) 輪狀病毒分析：引子設計選擇 A 群輪狀病毒非結構性蛋白 NSP3 基因片段中核酸序列高穩定區，引子對及探針序列如表一，反應產物 87bp。

Real-time RT-PCR 為單步驟反應，反應總體積 25 μ L，加入 5 μ L 病毒 RNA 抽取液，及混合液內含 5 μ L 5 \times TaqMan EZ 緩衝液 (Applied Biosystems), 3 mM MnCl₂, dATP、dCTP、dGTP、dUTP 各 300 μ M, 2.5U rTth DNA Polymerase, 0.25U AmpErase UNG, 引子均為 200 nM, 及探針 150nM。反應程序為：60 30min, 95 5min, 之後進入 45 個循環：94 20sec, 60 1min。結果由 ABI Prism 7500 Fast (Applied Biosystems)偵測分析。

- Multiplex Real-time RT-PCR :

由於各病毒之引子發生互相沾黏之現象，依照之前 Real-time PCR 設計之區域，重新設計諾羅病毒之引子及探針，序列如表一。

Multiplex real-time RT-PCR 為單步驟反應，反應總體積 50 μ L，各加入 3 μ L 病毒 RNA 抽取液，及混合液內含 25 μ L 2 \times RT-PCR 反應緩衝液 (BIO-RAD), 1 μ L iScript Reverse Transcriptase，分別加入輪狀病毒引子 200nM Rota NVP3-F、Rota NVP3-R 及 60nM 探針，諾羅病毒 GI 引子 200nM NoroGI-F、Noro GI-R 及 60nM 探針，和 GII 引子 200nM NoroGII-R NoroGII-F 及 60nM 探針進行 Real Time RT-PCR。反應程序為：50 10min, 95 5min, 之後進入 45 個循環：95 15sec, 60 30sec。結果由 MyiQ real-time detection system (BIO-RAD)偵測分析。

- Sapovirus Real-time RT-PCR :

Sapovirus 和 Norovirus 同屬於 Calicivirus，病毒全長共 7.5kb，共有 2 個 ORF。依病毒 capsid 基因可以分為五類 genotype (GI~GV)，其中感染人類為 GI、II、IV、V 四型。本實驗設計引子對如表一。

- 腺病毒 RT-PCR 反應引子設計及反應分析：

腺病毒 40、41 型引子設計在腺病毒基因之早期轉錄的區域 E1B 上，分別為 4041-1 和 4042-2，引子序列如表一。

RT-PCR 作用條件：各取病毒 DNA 萃取液 5 μ L 為模板，分別做腺病毒(Adhex-1 及 Adhex-2)及腺病毒 40、41 型(4041-1 及 4041-2)反應，各引子最終濃度為 300nM，再加入 200nM dNTP、1U Taq DNA Polymerase (Promega) 及緩衝溶液，反應總體積為 50 μ L，於 94 $^{\circ}$ C 作用 2 分鐘後，進行 PCR 35 循環：94 $^{\circ}$ C 30 秒，55 $^{\circ}$ C 1 分鐘，72 $^{\circ}$ C 1 分鐘，之後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

反應產物取 5 μ L，以 1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE) 配置之 2 % SeaKem LE Agarose (BMA, BioWhittaker Molecular Application)，100 伏特電泳跑膠，進行產物大小分析。

- 諾羅病毒的演化分析：

引子設計在病毒之 ORF1-ORF2 交接處，為 Viral RNAPolymerase 與結構性蛋白 capsid 區間，分別針對 GI 及 GII 設計，序列如表一。

RT-PCR 的反應步驟分為兩階段，(1) 反轉錄(reverse transcription)反應：取病毒 RNA 萃取液 5 μ L 為模板，加入 0.5U oligo(dT) (Invitrogen)，於 70 $^{\circ}$ C 5min，再加入 13 μ L 的反轉錄混合液，內含 1mM dNTP，40U of RNase inhibitor (Roach)，10U AMV Reverse Transcriptase (Promega)，於 42 $^{\circ}$ C 作用 1 小時進行反轉錄反應，合成 cDNA 後保存於 -20 $^{\circ}$ C。(2) PCR 反應：取 2.5 μ L cDNA 為模板，加入 22.5 μ L PCR 反應混合液，內含有 0.625 mM dNTP、2.5U Taq DNA Polymerase、300nM 引子 NP2-5 及 NP2-1648，反應總體積為 25 μ L。反應程序為：94 $^{\circ}$ C denature 3min，之後進入 40 個循環：94 $^{\circ}$ C 30sec，49 $^{\circ}$ C 1min 20sec，72 $^{\circ}$ C 30sec，之後 72 $^{\circ}$ C 加長作用 7 分鐘。

反應產物取 5 μ L，以 1 \times Tris-acetate-EDTA (TAE) 配置之 2 % SeaKem LE Agarose (BMA, BioWhittaker Molecular Application)，100 伏特電泳跑膠，進行產

物大小分析。

- 核酸定序：

使用 ABI PRISM (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit) 作核酸序列分析，反應條件如下：取適量 RT-PCR 反應產物、1 μ M 反應引子 SR33、1 μ L BigDye3.1、反應緩衝液，最後總體積為 10 μ L。將裝有反應物之微量離心管於 96 作用 1 分鐘，之後反應條件為 96 10 秒、50 5 秒、60 4 分鐘，共 25 次循環。

反應產物純化：為減少反應混合物中游離標記物之干擾，先將定序反應後之產物純化。將定序反應產物 10 μ L 加入等體積的 ddH₂O 60 μ L 的絕對酒精 5 μ L 的 125 mM EDTA，於室溫下靜置 15 分鐘，再以 4000 rpm 離心 30 分鐘；去除上清液後，以 70 % 酒精清洗，4000 rpm 離心 5 分鐘，最後將沉澱物烘乾，再加入 10 μ L Hi-diformamide。

基因定序反應：將純化後產物置於 96 作用 2 分鐘後，馬上置於冰上，再放入 ABI 3730 自動化核酸螢光定序儀 (DNA Autoseqencer) 進行核酸序列分析。

- 病毒基因演化分析比對

將 RT-PCR 產物經核酸定序分析後，多組臨床病毒基因序列及基因資料庫擷取之基因片段，以電腦軟體排序 (sequence align) 後，應用電腦軟體 PHYLIP 作病毒株演化種數分析，將有助於流行病學資料分析。

參、結果

一、腹瀉病毒流行趨勢分析：

A. 腹瀉症狀群聚監測

利用傳染病通報系統收集的群聚性腹瀉症狀糞便檢體。2005 年及 2006 年度分別收集 21 個及 85 個群聚事件，總檢體數分別為 467 件及 1270 件；其中，輪狀病毒感染事件年度檢測陽性事件數(率)為 2006 年 3 件(3.5%)，諾羅病毒感染事件年度分析為 2005 年 19 件 (90.4%)，2006 年 79 件 (92.9%)，結果整理如表二。

在傳染病通報的腹瀉症狀檢體中，主要年齡群大於 10 歲以上，為群聚性腹瀉聚集事件。依發病日期分析，顯示病毒性腹瀉主要集中於較冷冬季的月份，但在 2006 年 3 月及 6 月卻有些微上升；實驗分析感染原以諾羅病毒為主，發生陽性率約為輪狀病毒的 32 倍 (圖一)。此外，將諾羅病毒腹瀉群聚發生場所依 2005 年及 2006 年分年分析 (圖二-a,b,c)，在醫院的看護中心與安養院 (HNC) 發生率最高佔 47.3 % 及 77.3 % ，其次為學校佔 36.8 % 及 19 % ，據疫情調查資料顯示，傳播方式約 90 % 疑似為接觸性感染。

B. 10 歲以下孩童急性腸胃炎監測

本研究於北、中、南分別各找一家合作醫院，林口長庚醫院、彰化基督教醫院和高雄長庚醫院，因急性腸胃炎門診或急診轉住院之 10 歲以下孩童為分析對象，分別於每月中收集糞便檢體進行輪狀病毒基因型別分析，及臨床個案資料彙整。自 2004 年 4 月起開始執行，持續進行至 2006 年 10 月止，分別收集 820 件、801 件及 1946 件糞便檢體，輪狀病毒檢測年度總陽性率為 14.15%、18.73%及 23.78%，中部陽性率均比北部及南部高，而南部在今年度的輪狀病毒陽性率也比前兩年增加許多 (表三)。

在腹瀉病毒月份流行趨勢 (圖三)，以個案發病就醫後檢體採檢日統計分析，在計畫開始收集 2004 年 3 月為輪狀病毒陽性高峰，三年間分析資料顯示台灣本地之流行季節分布在 11 月至次年 5 月間，高峰期約在 3 月份。諾羅病毒感染流行曲線在 2004 年 9 月開始拉高，11-12 月間為流行高峰，至隔年才緩慢下降，於 2005 年底有零星陽性感染個案，但在 2006 年 2 月起陸續開始出現陽性個案，到 7 月陽性件數急速上升，陽性率

達 31.3 % ~40 %。星狀病毒檢測中，2004、2005、2006 年間分別檢出 5、9、30 件陽性；2005 年 12 月至 2006 年 3 月期間，有一小波星狀病毒流行，檢出陽性率 4.84 %、4.21 %、2.69 % 及 6.02 %。

10 歲以下孩童感染輪狀病毒的年齡層分析（圖四），在 5 個月大至 2 歲間為一感染高峰期，將近 5 成孩童已被輪狀病毒感染；在 2 歲之後感染情形稍緩，但在 5-6 歲間似乎又有一小波感染高峰；累計至 6 歲前約 98% 的孩童已被輪狀病毒感染。

二、病毒基因型別分析

A、輪狀病毒基因型別分析

輪狀病毒基因型別分析，以 RT-PCR 檢測輪狀病毒 Group A VP7 基因，並定序分析，相關基因序列已經存檔鍵入本局基因庫網站中。依產物定序結果與 GeneBank 比對分析，分年（93/94/95）流行趨勢如下（圖五）：G1（11.9%，23.4%，34.4%），G2（35.9%，17.6%，6.3%），G3（26.1%，19.1%，34.4%），G4（0，0.5%，0），G9（26.1%，21.7%，24.6%），並於 95 年發現一新病毒株 G12，與其他國家序列比對之後發現較接近於印度流行株（圖六）。在 2004 年度，以 G2 為主要流行型別，其次為 G3 及 G9；在 2005 年度，型別稍有轉換，G1 為主要流行型別，G9、G3 陽性率仍高，但是 G1 陽性成長率由 11.9% 急速上升至 23.4%，另外在 2005 年度出現一件 G4 型陽性；在 2006 年度至 9 月為止，G1、G3 已成為主要流行株，而 G9 陽性率稍微下降，但整體上 G1、G3、G9 的陽性個數均較往年高許多（圖五）。在地區型別轉換的分析上（表四），在 2004 年至 2006 年 3 年間，各地醫院流行型別變化，北部醫院前兩年以 G2 為主今年 G3 及 G9 均呈上升趨勢，中部醫院這三年均有極大變化，由 G3 至 G9 至 G1，南部醫院 93 年以 G2 為主，2005 年 G1、G2、G3 均很高但以 G1 為主，但今年仍以 G1 及 G3 為主要流行株。今年度型別改變多發生在中南部地區，尤其南部今年輪狀病毒檢出陽性率較前兩年高出許多。

B、諾羅病毒基因序列演化分析

諾羅病毒由於病毒本身變異性相當大，各地發現之病毒基因序列不同，因此在全球中一直無法以單一特定基因區域檢測或分型分析，但大致可以區分成 GI 及 GII 兩

大基因型，在台灣地區以 GII/4 型為主，佔諾羅病毒總陽性率 94.5 %。另外，在 2004 年底至 2006 年 11 間，在台灣地區發生起諾羅病毒引起之起腹瀉群突發事件，尤其，在今年群聚事件數倍數上升，為了解台灣地區諾羅病毒間之演化情形，並與國外地區種源親源性，本研究中於 ORF1-ORF2 junction site 設計引子對進行 RT-PCR 增殖複製及序列分析，定序後結果利用 phylip 3.5 系統 Neighbor-Joining 分析，分析結果如圖七、圖八。

三、腹瀉病毒陽性個案臨床症狀分析

就 2004 年度合約實驗室收集管道中輪狀病毒及諾羅病毒陽性個案，回溯性病歷調查，結果如圖九，輪狀病毒感染病患腹瀉主要為水樣便，發燒、腸胃道不適及上呼吸道症狀較明顯；諾羅病毒感染病患，排便出現黏液狀較多，並有極高比率病人出現抽筋現象，腹痛較明顯。

肆、討論

在本研究的結果顯示，台灣地區病毒性腹瀉感染，依年齡層大致可以分成兩類：在 10 歲以下孩童，以輪狀病毒感染為主，其次為諾羅病毒。在腹瀉群聚事件中，發生感染族群為成人，主要感染原為諾羅病毒。

A、腹瀉症狀群聚監測

諾羅病毒的感染模式多為群聚性感染，因此自 2005-2006 年間可以發現，以傳染病通報腹瀉症狀或食物中毒事件中收集的檢體，諾羅病毒陽性檢出率 46.19 % 較高，而輪狀病毒陽性率僅佔 1.15 %，大約為 40 倍（表二），感染年齡層以成人為主。在 2005 年間病毒性腹瀉或腸胃炎通報的群聚事件中，發生場所在安養院、教養院及看護中心佔 47.37 %，學校佔 36.84 %，2006 年醫院病房及安養中心為主要發生感染場所佔 77.38 %（圖二），配合本局疫情調查資料，發現多數調查之食物類別資料並不完整，但部份的資料顯示在症狀發生期間食用均為非海鮮魚貝類，而飲用水全部為自來水非地下水，因此，推測應為接觸性途徑傳染為主；尤其看護中心、安養或教養院，患者多為行動不便或智能不足者，必須有看護人員協助飲食及排泄物處理，特別其中有多次疫情，醫護人員或工作人員為諾羅病毒檢出陽性帶原者，並且在其中一次事件中發現，在發病三星期之後採檢該工作人員仍檢出諾羅病毒陽性，因此，顯出應加強監督看護人員在照護處理時衛生教育，並應要求醫院嚴格安排有症狀之照護人員工作內容。

文獻研究曾提出諾羅病毒基因變異度相當高，在病毒的 ORF1 及 ORF2 基因區，為病毒進行 recombination 處，利用此區段基因序列可以區分成 7 種 GI genotype 及 12 種 GII genotype，台灣地區在 2005-2006 年間，共發生 98 起諾羅病毒引起的群聚事件，經由序列相似性比對，顯示台灣地區主要感染有近九成為 GII 型諾羅病毒，目前分析流行基因型有 GII.2、GII.3、GII.4、GII.6，其中又以 GII.4 為主要流行型別（圖七），主要流行病毒株與鄰近台灣的日本地區相似。

由於在 2005 年及 2006 年諾羅病毒在群聚事件檢測出之陽性比例差異極大，為了解在台灣地區病毒序列是否發生變化，因此就台灣地區主要流行株 GII.4 序列分析（圖

八) 分別就 GeneBank 中找尋其他國家各期諾羅病毒 GII.4 序列作為參考序列, US95/96 cluster 代表 1995-1996 年代 GII.4 序列, Farmington Hill cluster 代表 2001-2003 年 GII.4 序列, Hunter'04 cluster 代表 2004 年 GII.4 序列。其中僅有一株 2006 年群聚分離株 (06-AM-11) 落在 Farmington Hill cluster; 而 2005 年群聚事件病毒株 (04-A-4, 04-B-11, 05-C-24, 05-D-33, 05-E-56, 05-F-63, 05-H-69, 05-I-76, 05-L-91) 多數落在 Hunter'04 cluster; 少部分 2005 年及大部分 2006 年間群聚事件的病毒株都落在三組參考序列之外, 並且還可區分成兩個 cluster, 其中有三個群聚病毒株 (05-H-07, 05-E-53, 06-D-13) 歸類於 cluster 1, 為亞洲地區 GII.4 參考株, 包括越南、日本及中國; 多數 2006 年群聚病毒株均自成一個 cluster, 與 GeneBank 中發現的 2006 年英國病毒株較類似。因此, 台灣地區病毒株序列確實有因年度而變化, 尤其 2006 年序列自成一個 cluster, 這是否改變病毒致病型態而造成今 (2006) 年度群聚事件暴增有相關, 必須將病毒 ORF1 及 ORF2 序列作完整定序比對, 因此本實驗室接續會就本地諾羅病毒序列變化詳細分析, 並對於序列變化位置與致病力改變相關性作進一步探討。

台灣地區感染的在 2004-2005 年檢體中, 由於星狀病毒陽性僅佔 8 件, 平均病毒陽性檢出率僅 0.54%, 無法推測其感染流行情形, 但病毒的檢出陽性率與其他國家相似。

此外, Sapovirus 在日本地區腹瀉群聚事件發生率約佔 5%, 因此, 本研究中曾對於諾羅病毒或輪狀病毒檢測陰性的檢體分析, 到 2006 年 11 月止, 尚未檢出 Sapovirus 陽性檢體。

B、10 歲以下孩童急性腸胃炎之腹瀉病毒感染分析

自 2004 年至 2006 年, 輪狀病毒陽性分年年度總檢出陽性率 14.15%、18.73%、23.78%; 諾羅病毒陽性分年年度檢出率 9.76%、4.25%、19.0%; 星狀病毒陽性分年年度檢出率 0.74%、0.38%、1.54% (表三)。

由分析結果中, 發現孩童輪狀病毒陽性率逐年上升, 尤其在南部地區的陽性率改變較大, 北部地區稍為提高, 因檢體收案定義及地點均無變更, 推測在台灣地區輪狀病毒

感染情形似乎增強，並且有南移的趨勢。

依月份分析病毒檢出陽性之流行概況顯示(圖三)，輪狀病毒在3月為一高峰期，並隨月份增加天氣變熱後逐步遞減，第二年在10月開始上升至隔年4月逐漸下降，第三年月份分布曲線與第二年近似；就每年高峰期3月來看，病毒感染率似乎有每間隔2年增強，是否如此必須持續監測。諾羅病毒感染流行曲線在2004年9月開始拉高，11-12月間為流行高峰，至隔年才緩慢下降，於2005年底有零星陽性感染個案，但在2006年2月起陸續開始出現陽性個案，到7月陽性件數急速上升，陽性率達31.3%~40%；諾羅病毒的流行情形，在2006年有提早趨勢，並且與群聚事件(成人感染)流行趨勢很像(圖一)，月份稍為提早，文獻中曾提到諾羅病毒感染約有3成為無症狀帶原者，而台灣群聚流行族群多發生於老人安養中心(圖二)，因此，推論是否無症狀成人扮演帶原者傳播給家中孩童及年紀較大親屬，或因工作場所的因素散播給照護的老人，必須對該病毒傳播途徑及環境危險因子詳加探討。星狀病毒檢測中，2004、2005、2006年間分別檢出5、9、30件陽性；2005年12月至2006年3月期間，有一小波星狀病毒流行，檢出陽性率4.84%、4.21%、2.69%及6.02%。星狀病毒感染流行情形似乎與月份及天氣較無相關性，但在台灣地區由於陽性個案數太低，仍無法確切評斷。

整體來看，實驗分析結果在9月至隔年3月為腹瀉性病毒的主要流行期(圖三)，與本局2003-2006年定點醫師監視通報系統趨勢圖比較(圖十)，在第4周到第10周為通報病歷高峰期，高峰期出現在第7-8周，另外在第25-40周也有一小波感染；就學校傳染病監視通報系統趨勢比較(圖十一)，通報腹瀉症狀學生人數較多出現在每年的第2-16周及第40-45周，特別高峰在3月左右。由於，定點醫師監視通報主要為診所，通報個案數以小孩為主，而學校傳染病監視通報系統包含全國134所公立小學及附設幼稚園，本研究以大型醫院為主，二個監測系統與實驗分析流行期間相近。

在台灣地區10歲以下孩童感染輪狀病毒的年齡層分析(圖四)，在5個月大至2歲間為一感染高峰期，將近5成孩童已被輪狀病毒感染；在2歲之後感染情形稍緩，但在5-6歲間似乎又有一小波感染高峰；累計至6歲前約98%的孩童已被輪狀病毒感染。

文獻中也指出各國統計資料中輪狀病毒感染以 5 歲以下孩童為主，尤其是嬰幼兒；另外，合作醫院為教學醫院，其採集腹瀉糞便檢體之對象為 10 歲以下孩童，年齡層散佈較均勻，因此輪狀病毒陽性檢出率約為 2 成，此數據與其他國家之統計數相近似。

輪狀病毒在台灣地區基因型流行情形，在 2004 年度，以 G2 為主要流行型別，其次為 G3 及 G9；在 2005 年度，型別稍有轉換，G1 為主要流行型別，G9、G3 陽性率仍高，但是 G1 陽性成長率由 11.9% 急速上升至 23.4%，另外在 2005 年度出現一件 G4 型陽性；在 2006 年度至 9 月為止，G1、G3 已成為主要流行株，而 G9 陽性率稍微下降，但整體上 G1、G3、G9 的陽性個數均較往年高許多（圖五）。在地區型別轉換的分析上（表四），在 2004 年至 2006 年 3 年間，各地醫院流行型別變化，北部醫院前兩年以 G2 為主今年 G3 及 G9 均呈上升趨勢，中部醫院這三年均有極大變化，由 G3 至 G9 至 G1，南部醫院 93 年以 G2 為主，2005 年 G1、G2、G3 均很高但以 G1 為主，但今年仍以 G1 及 G3 為主要流行株。今年度型別改變多發生在中南部地區，尤其南部今年輪狀病毒檢出陽性率較前兩年高出許多。

輪狀病毒感染的孩童在臨床症狀表現相當明顯（圖九），出現水便性腹瀉次數高於 5 次以上的個案相當多，而嘔吐的情形也相當嚴重，有九成以上必須急診並住院觀察與治療，造成的醫療成本相當高。美國曾於 1999 年論文顯示，急性腸胃炎造成的醫療成本為上億元。因此，目前對於輪狀病毒疫苗臨床測試的論文中顯示，疫苗服用後似乎可以降低孩童在輪狀病毒感染時的臨床反應。

伍、結論與建議

目前台灣地區病毒性急性腸胃炎，孩童主要感染原為輪狀病毒，其次為諾羅病毒。輪狀病毒感染多發生於較冷的月份，並且以 2 歲以下嬰幼童為主，臨床症狀表現相當明顯，有九成以上必須住院觀察與治療，仔細評估計算醫療成本及照顧者之社會成本相當高，在 2006 年 10 月台灣地區已經核准兩家輪狀病毒疫苗上市，在台灣地區輪狀病毒流行型別為 G1、G2、G3 及 G9 型，兩家上市疫苗中，其中一家為 G1 型，另外一家為 G1、G2、G3、G4、P8 五價型疫苗，上市疫苗對於台灣地區流行型別並未完全涵蓋，是否具有有效保護效果，需要在明年度持續監測；此外，輪狀病毒為人畜共通性病毒，在疫苗上市前，本實驗室曾分出一株 G 12 行動物株，在疫苗上市推廣後，是否會出現之前的罕見輪狀病毒株流行，仍必須多加重視。目前輪狀病毒疫苗售價並不便宜，而疫苗服用與否是否能夠與疫苗預期達到保護效力之降低醫療支出抗衡，相當值得後續探討。

諾羅病毒為群聚性感染的主要致病原，在其他國家多數為糞便污染水源途徑散播，或經由食物處理者二次傳染，在台灣，經由諾羅病毒傳播的途徑並不明確，只能從疫調資料分析推測為接觸性傳染，因此須配合衛生單位之詳細調查才能具體分析。因此，除必須加強衛生單位對於病毒性腹瀉群聚性調查及採檢的教育，並應對於民眾進行衛教宣導，才能有效降低群聚性感染。對於醫療單位及安養照護中心，應加強執行個人及環境清潔衛生觀念，避免照護人員在有症狀情況下成為疾病傳播者。

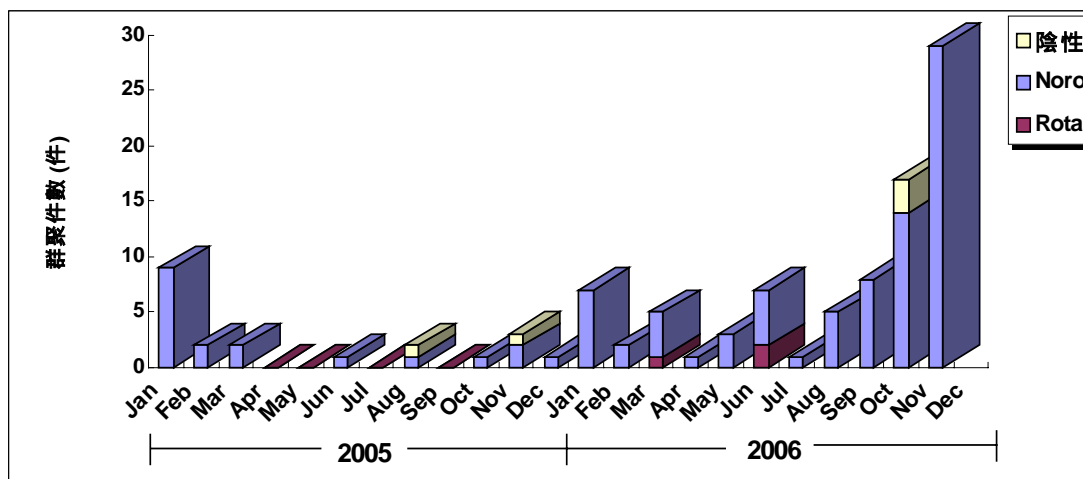
陸、参考文献

1. Allard A, Kajon A, Wadell G : Simple procedure for discrimination and typing of enteric adenoviruses after detection by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1994 ; 44 : 250-257.
2. Ando, T, Monroe SS, Gentsch JR, Jin Q, Lewis DC, Glass RI : Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin Microbiol* 1995 ; 33 : 64-71.
3. Ando T, Noel JS, Fankhauser RL : Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J Infect Dis* 2000 ; 181(suppl 2) : S336-48.
4. Carter MJ : Genomic organisation and expression of astroviruses and caliciviruses. *Arch Virol* 1994 ; 9(suppl) : 429-439.
5. Gouvea V, Glass RI, Wood P, Taniguichi K, Clark HF, Forrester B, Fang ZY : Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J Clin Microbiol* 1990 ; 28 : 276-282.
6. Herring AJ, Inglis NF, Ojeh CK, Snodgrass DR, Menzies JD : Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J Clin Microbiol* 1982 ; 16 : 473-477.
7. Herrman JE, Nowak NA, Perron-Henry DM, Hudson RW, Cubitt WD, Blacklow NR : Diagnosis of Astrovirus Gastroenteritis by Antigen Detection with Monoclonal Antibodies. *J Infect Dis* 1990 ; 161 : 226-229.
8. Jiang X, DY Graham, K Wang, MK Estes : Norwalk virus genome cloning and characterization. *Science* 1990 ; 250 : 1580-1583.
9. Jonassen TO, Kjeldsberg E, Grinde B : Detection of human astrovirus serotype 1 by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1993 ; 44 : 83-88.
10. Kapikian AZ, Chanock RM : Rotaviruses. In: Fields, B. N. Knipe D.M. (Eds.), *Virology*, Second ed. Raven Press, New York, pp. 1990 ; 1353-1404.
11. Martin AL, Follet AC : An assessment of the sensitivity of three methods for the detection of rotavirus. *J Virol Meth* 1987 ; 16 : 39-44.
12. Madeley CR : Viruses associated with Acute Diarrhoeal Disease. In *Principles and Practices of Clinical Virology*. (eds A.J. Zuckerman et al). John Wiley and Sons Ltd., 1990 : 188-189.
13. Nakata S, Honma S, Numata K, Kogawa K, Ukae S, Adachi N, Jiang X, Estes MK, Gatheru Z, Tukei PM, Chiba S : Prevalence of human calicivirus infections in Kenya as determined by enzyme immunoassays for three genogroups of the virus. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 3160-3163.
14. Oishi I, Yamazaki K, Kimoto T, Minekawa Y, Utagawa E, Yamazaki S, Inouye S,

- Grohmann GS, Monroe SS, Stine SE, Carcamo C, Ando T, Glass RI : A large Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Astrovirus among Students and Teachers in Osaka, Japan. *J Inf Dis* 1994 ; 170 : 439-443.
15. Utagawa ET, Nishizawa S, Sekine S, Hayashi Y, Ishihara Y, Oishi I, Iwasaki A, Yamashita I, Miyamura K, Yamazaki S, Inouye S, Glass RI : Astrovirus as a Cause of Gastroenteritis in Japan. *J Clin Microbiol* 1994 ; 1841-1845.
 16. Willcocks MM, Carter MJ, Silcock JG, Madeley CR : A dot-blot hybridisation procedure for the detection of astrovirus in stool samples. *Epidemiol Infect* 1991 ; 107 : 405-410.
 17. Willcocks MM, Carter MJ, Madeley CR : Astroviruses. Reviews. *Med Virol* 1992 ; 2 : 97-106.
 18. Wolfaardt M, Taylor MB, Booysen HF, Engelbrecht L, Grabow WO, Jiang X : Incidence of human calicivirus and rotavirus infection in patients with gastroenteritis in South Africa. *J Med Virol* 1997 ; 51 : 290-296.

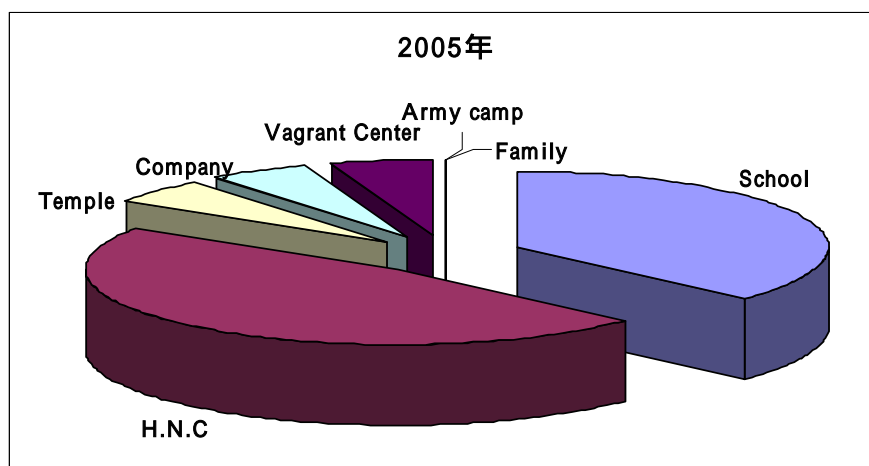
柒、圖、表

圖一、2005 至 2006 年間病毒性群聚腹瀉月份流行趨勢

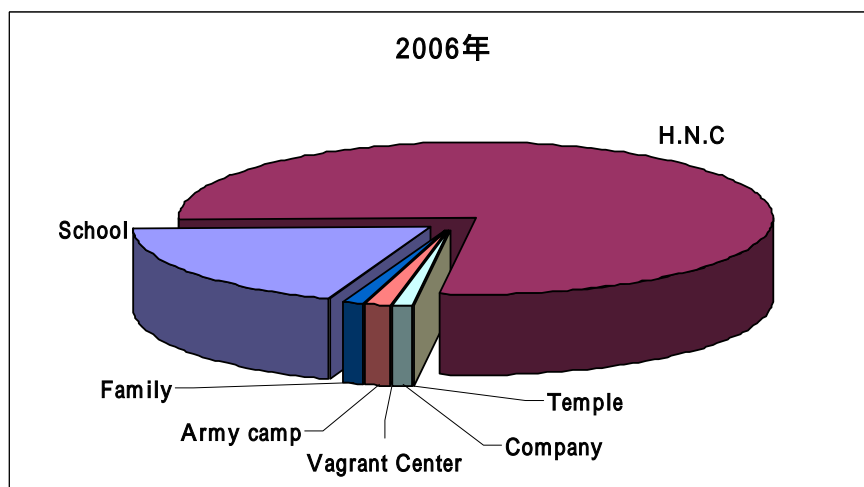


圖二、諾羅病毒群聚事件發生場所分布情形

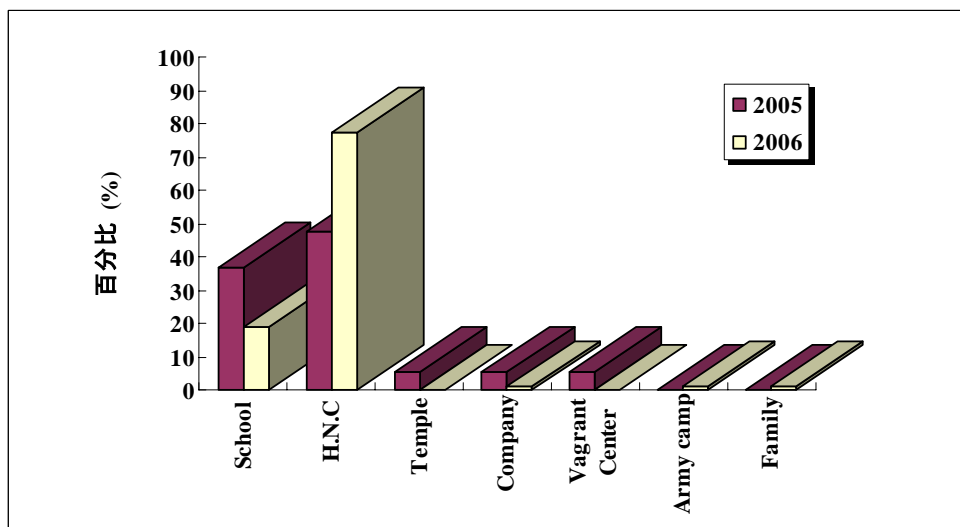
a.



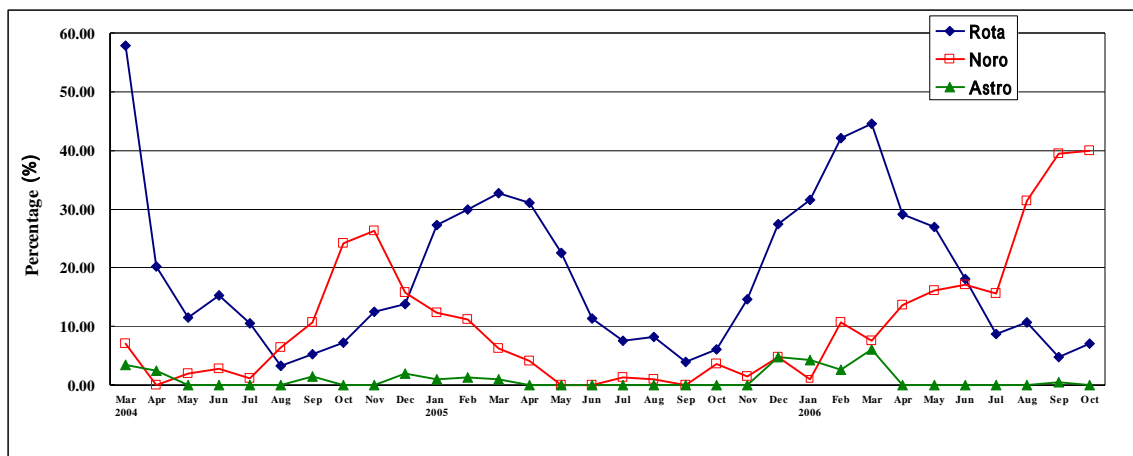
b.



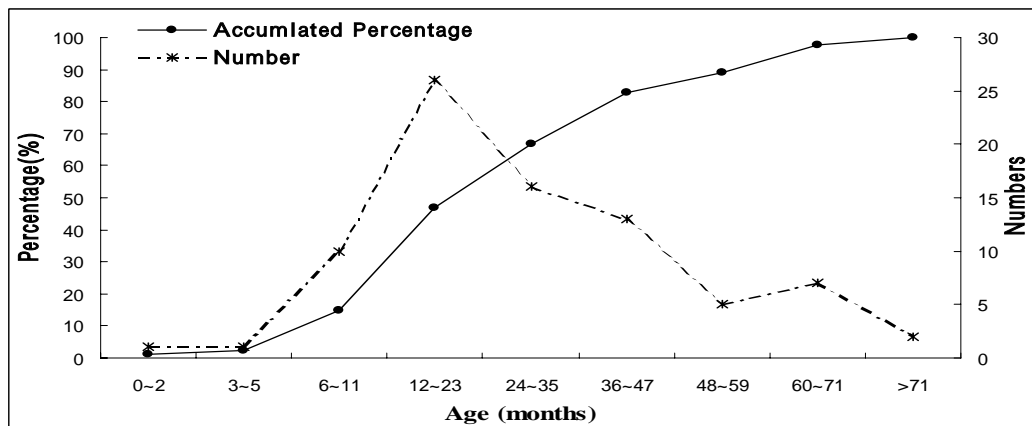
C.



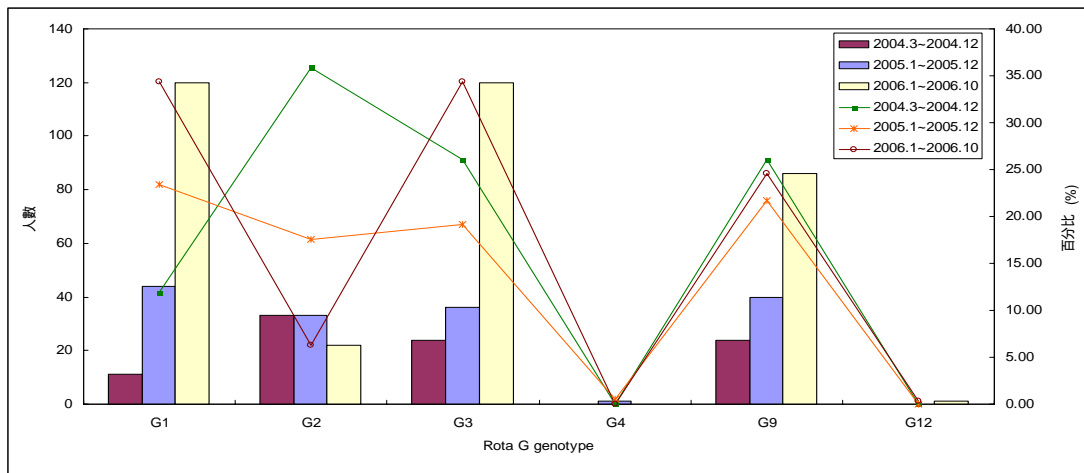
圖三、2004 至 2006 年間造成孩童急性腸胃炎腹瀉性病毒流行趨勢分析



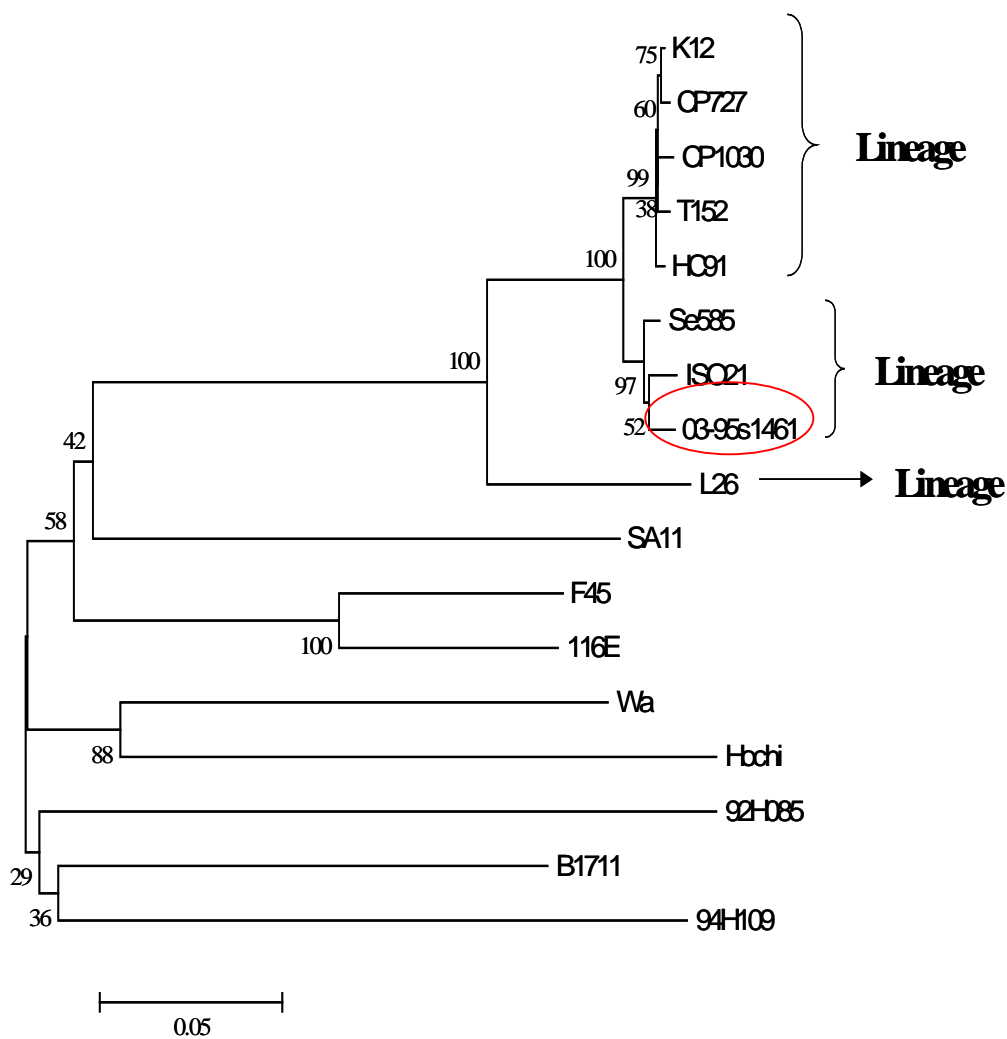
圖四、感染輪狀病毒孩童年齡分布趨勢圖



圖五、2004-2006 年 輪狀病毒 G 基因型別分析



圖六、2006 年新型輪狀病毒 G12，台灣分離株與其他國家序列比對親源分析圖



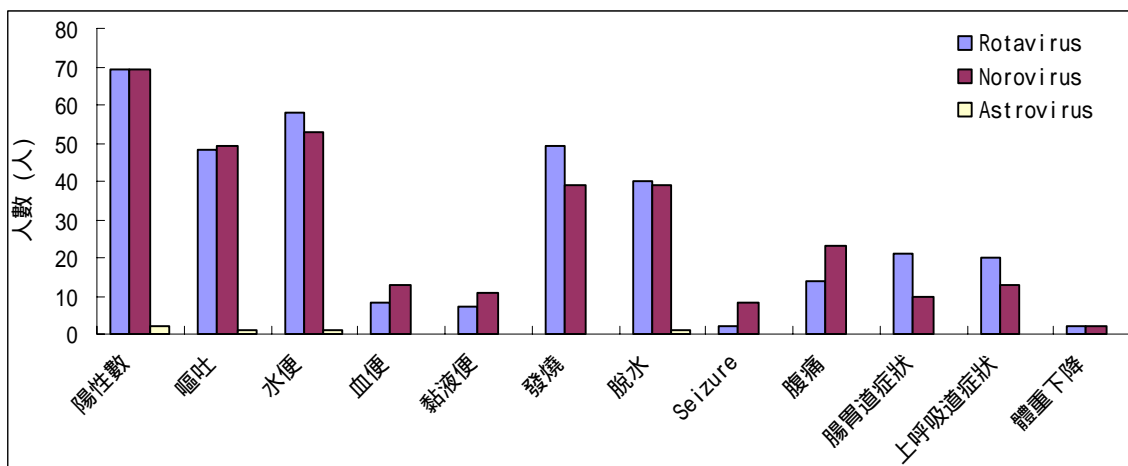
圖七、台灣地區與世界各地諾羅病毒序列演化分析



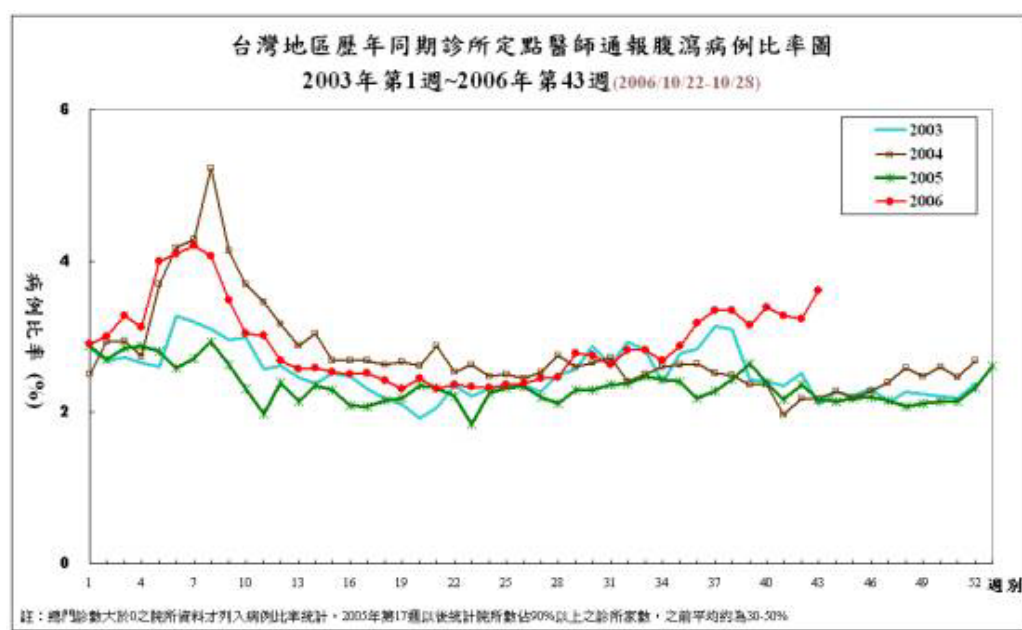
圖八、台灣地區與世界各地諾羅病毒 GII.4 序列演化分析



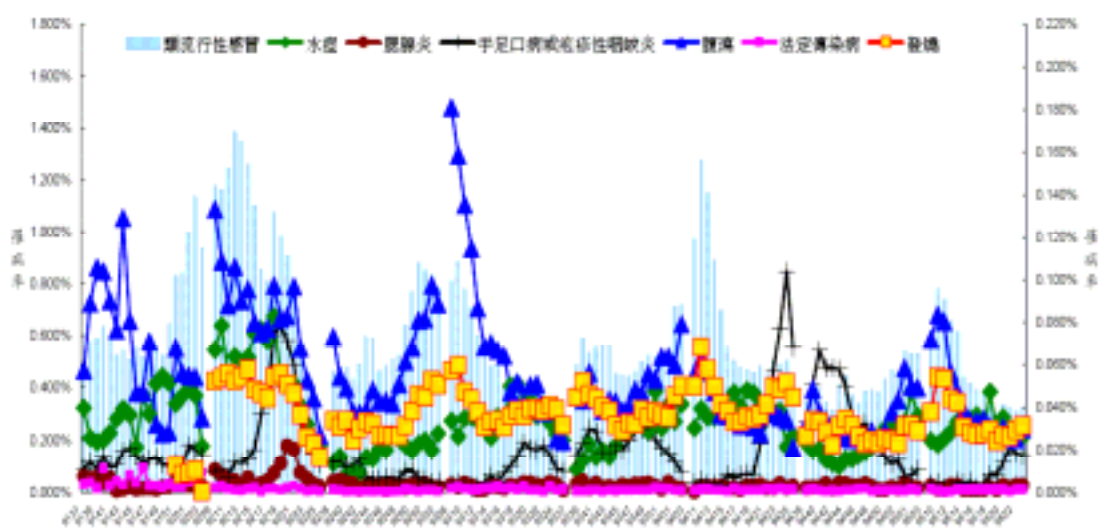
圖九、腹瀉病毒檢出陽性個案臨床症狀分析



圖十、2003-2006 年間台灣地區診所定點醫師通報監測趨勢圖



圖十一、學校傳染病監視通報系統分項疾病流行趨勢圖



表一、腹瀉病毒引子對序列表

核酸引子	5' 3' 序列	Localization
A. Multiplex Real-time RT-PCR 引子對序列		
Rotavirus		
Rota NVP3-F	ACCATCTACACATGACCCTC	963-982
Rota NVP3-R	GGTCACATAACGCCCC	1034-1049
Rota-probe	FAM-CGCGATTTTTGACAGTGTTAGCTTTTAACTATCGCG-D B	1018-1042
Norovirus		
NoroGI-F	ATCAAGACTGGTGGATTGG	5240-5259
NoroGI-R	GACGCCATCATCATTTACG	5371-5390
NoroGI-probe	HEX-CGCGATATGACCTCGGATTGTGGACAGGAATCGCG-DB	5307-5340
NoroGII-F	GAGTGACGCCAACCCATC	5099-5117
NoroGII-R	TACAGGTGCCGCAATAGC	5207-5225
NoroGII-probe	TEXAS-CGCGATCAGCCATAACCTCATTGTTGACCTCTGGGA CGCG-BHQ2	5168-5195
B. Sapovirus		
SaV124F	GAY CAS GCT CTC GCY ACC TAC	5078-5098
SaV1F	TTG GCC CTC GCC ACC TAC	700-717
SaV5F	TTT GAA CAA GCT GTG GCA TGC TAC	5112-5135
SaV1245R	CCC TCC ATY TCA AAC ACT A	5163-5181
SaV124TP	FAM-CCR CCT ATR AAC CA-MGB-NQF	5105-5118
SaV5TP	FAM-TGC CAC CAA TGT ACC A -MGB-NQF	5142-5157
C. Adenovirus		
Adhex-1	GCCACCGATACGTA CTTCAGCCTG	99-123
Adhex-2	GGCAGTGCCGGAGTAGGGTTTAAA	360-336
4041-1	CTGATGGAGTTTTGGAGTG	1410-1429
4041-2	CCATTAGCCTGCTCCTTA	3894-3876
D. Norovirus		
G1-SKF	CTG CCC GAA TTY GTA AAT GA	5342-5361
G1-SKR	CCA ACC CAR CCA TTR TAC A	5652-5671
G2-SKF	CNT GGG AGG GCG ATC GCA A	5058-
G2-SKR	CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT	-5401

表二、腹瀉群聚事件結果分析

	總檢驗 件數	Noro 事 件數	Rota 事 件數	陰性事 件數	檢驗人 數	Noro 陽 性人數	Rota 陽 性人數	陰性人 數
2005	467	19	0	2	202	85	1	116
2006	1270	79	3	3	1179	553	15	611

表三、2004-2006 年腹瀉病毒地區年度檢出陽性數 (率)

採檢醫院	北部			中部			南部			總件數		
	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006
輪狀病毒 陽性件數(率)	49 (12.31)	43 (13.44)	199 (19.64)	47 (21.36)	70 (27.24)	81 (28.32)	20 (9.90)	37 (16.52)	173 (26.74)	116 (14.15)	150 (18.73)	453 (23.28)
諾羅病毒 陽性件數(率)	52 (13.07)	19 (5.94)	192 (18.95)	11 (5.00)	8 (3.11)	51 (17.8)	17 (8.42)	7 (3.13)	126 (19.5)	80 (9.76)	34 (4.25)	369 (19.0)
星狀病毒 陽性件數(率)	2 (0.63)	1 (0.31)	17 (1.68)	3 (1.57)	1 (0.39)	5 (1.75)	0 (0.00)	1 (0.45)	8 (1.24)	5 (0.74)	3 (0.38)	30 (1.54)

表四、2004-2006 年輪狀病毒地區 G genotype 分析

G 基因型別分析												
地區	北部			中部			南部			總數		
年度	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006	2004	2005	2006
G1	5 (10.2)	8 (18.6)	35 (26.7)	4 (14.3)	14 (20.0)	34 (45.9)	2 (10.0)	14 (37.8)	51 (35.4)	11 (11.3)	36 (24.0)	120 (34.4)
G2	18 (36.7)	17 (39.5)	17 (13.0)	7 (25.0)	15 (21.4)	0 (0.0)	8 (40.0)	9 (24.3)	5 (3.5)	33 (34.0)	41 (27.3)	22 (6.3)
G3	8 (16.3)	11 (25.6)	43 (32.8)	14 (50.0)	9 (12.9)	29 (39.2)	2 (10.0)	10 (27.0)	48 (33.3)	24 (24.7)	30 (20.0)	120 (34.4)
G4	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.6)	0 (0.0)
G9	15 (30.6)	6 (13.9)	35 (26.7)	2 (7.1)	30 (42.9)	11 (14.9)	7 (35.0)	3 (8.1)	40 (27.8)	24 (24.7)	39 (26.0)	86 (24.6)
G12	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)
NS	3 (6.1)	1 (2.3)	0 (0.0)	1 (3.6)	1 (1.4)	0 (0.0)	1 (5.0)	1 (2.7)	0 (0.0)	5 (5.1)	3 (2.0)	0 (0.0)
Total	49	43	131	28	70	74	20	37	144	97	150	349